

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

BLOQUEIO DE OÓCITOS DE BORREGAS EM VESÍCULA GERMINATIVA COM ROSCOVITINA

Raphael Colombo GASPAR*¹, Sony Dimas BICUDO², Fernanda da Cruz LANDIM-ALVARENGA²; Leticia Ferrari CROCOMO¹, Sergio LEDDA³.

*autor para correspondência: rccgaspar@msn.com

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

²Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil

³Universidade de Sassari, Sardegna, Itália.

Abstract: The sheep farming is an attractive and profitable agricultural activity with the possibility of intensification through the application of reproductive biotechnologies as in vitro embryo production. So, the present study evaluated the roscovitine potential to arrest the meiosis of complexes cumulus-oocytes from prepubertal sheep on germinal vesicle stage aimed to offer additional time for oocyte maturation acquisition. For this, cumulus-oocytes complexes were in vitro cultured with (treatment) and without (control) 75 μ M roscovitina for 6 hours at 5% CO₂ and 38,5°C. At the end of this period, the nuclear status of oocytes from both experimental groups was assessed under stereomicroscope. Our results demonstrated that roscovitine is a promising meiosis inhibitor with 95,4% of oocytes arrested at germinal vesicle (GV) in comparison with 44,5%; 24,6%; 30,9% of oocytes from control at GV, GV breakdown and metaphase I. Complementary studies are being performed to evaluate the roscovitine reversibility and its effect on embryo development.

Palavras-chave: embrião, estágios, reprodução, ovócito, ovinos

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Introdução

A ovinocultura, por suas características de ciclo produtivo curto, fácil manejo, rápido giro financeiro e viabilização de pequenas áreas, consiste numa atividade atrativa e extremamente rentável. Apesar do cenário favorável à sua intensificação, esta atividade ainda carece de investimento, principalmente científico e tecnológico. Neste contexto, a exemplo do que ocorreu na bovinocultura, o aprimoramento e aplicação comercial de biotécnicas reprodutivas como a produção de embrião *in vitro* (PIV) representa uma alternativa promissora para incremento da produtividade do setor. A utilização de oócitos de fêmeas pré-púberes em PIV possibilita ainda a otimização da fêmea doadora e redução do intervalo de gerações. No entanto, o complexo cumulus-oócitos (COCs) de animais pré-púberes possuem menor competência para suportar as posteriores fases do desenvolvimento, visto que, ainda não sofreram todas as alterações ultraestruturais e moleculares necessárias (Morton et al., 2008). Além disso, a parcela de oócitos de animais pré-púberes que atingem o estágio de blastocisto é baixa e as taxas de má formação e perda fetal são altas comparadas àquelas obtidas de doadoras adultas (Ptak et al., 1999). Neste contexto, a inibição temporária da meiose consiste numa alternativa interessante para melhorar o potencial de desenvolvimento dos oócitos de borregas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência da roscovitina, como um inibidor de quinases dependente de ciclinas (CDKs), em inibir a meiose em COCs cultivados *in vitro*.

Material e Métodos

Os COCs foram recuperados de ovários de borregas, por meio da técnica de *slicing* ou fatiamento com auxílio de bisturi e pinça, em meio TCM-199 HEPES suplementado com antibióticos e 0,1% de álcool polivinílico a 30°C. Sob estereomicroscópio, os COCs foram avaliados e somente aqueles com várias camadas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo foram selecionados e transferidos para meio básico de maturação constituído por TCM 199, 10% de soro

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

de ovelha em estro tratado termicamente, 100 μM cisteamina, 0,36 μM piruvato (controle) suplementado com 75 μM roscovitina (tratamento). Nessa condição, cerca de 20 COCs foram cultivados, por seis horas, em placas de Petri quatro poços com 450 μL de meio sem óleo mineral, sob 5% de CO_2 em ar a 38,5°C. Após seis horas de cultivo *in vitro*, as células do *cumulus* foram removidas dos COCs por meio de repetida pipetagem em TCM-199 HEPES. Em seguida, os oócitos desnudos foram transferidos para pequenas gotas Hoechst 33342 dissolvidas com glicerol (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em lâmina de vidro coberta com lamínula e fixada com silicone. Sob microscópio de fluorescência, os oócitos foram avaliados e classificados de acordo com proposto por Shirazi et al. (2010) em: vesícula germinativa (GV), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), anáfase (Ana.), telófase (Telo.) e metáfase II (MII). Os oócitos em MII foram considerados maduros e aqueles com estrutura nuclear alterada foram classificados como degenerados. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 5 repetições com, aproximadamente, 20 COCs por tratamento. Os resultados obtidos foram transformados em raiz de $(x+0,5)$, submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA), sob o número de protocolo nº. 13 / 2016.

Resultados e Discussão

A quantidade de oócitos do grupo tratamento mantida no estágio de VG (95,4%) foi significativamente maior do que o observado no grupo controle (44,5%), o que indica que a adição roscovitina a 75 μM foi eficiente em prevenir a retomada da meiose em oócitos de ovelhas pré-púberes durante seis horas de cultivo *in vitro* (tabela 1).

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Tabela 1 - Maturação nuclear em oócitos de borregas após 6 horas de cultivo *in vitro* em meio básico de maturação (controle) suplementado com 75µM roscovitina (tratamento). Vesícula germinativa (GV), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), anáfase (Ana.), telófase (Telo.), metáfase II (MII), degenerado (Deg.)

Tratamentos	COC (n)	Estágios nuclear (%)						
		GV	GVBD	MI	MII	Ana.	Telo.	Deg
Controle	110	44.5 ^{aB}	24.6 ^{aA}	30.9 ^{aA}	0.0 ^{bA}	0.0 ^{bA}	0.0 ^{bA}	0.0 ^{bA}
Roscovitina	116	95.4 ^{aA}	4.6 ^{bB}	0.0 ^{bB}	0.0 ^{bA}	0.0 ^{bA}	0.0 ^{bA}	0.0 ^{bA}

*Letras minúsculas indicam diferenças nas linhas e letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas (teste Tukey a 5% de probabilidade).

Em contraste, proporção significativamente maior de oócitos do grupo controle alcançou os estágios GVBD (24,6%) e MI (30,9%), enquanto apenas 4,6% e 0% dos oócitos tratados com roscovitina atingiram estes mesmos estágios, respectivamente (P<0,05). Estes resultados corroboram as observações realizadas por Crocomo et al. (2016) em COCs de ovelhas adultas submetidos as mesmas condições de cultivo. Resultados similares (VG>80%) também foram constatados em caprinos (Han et al., 2006), suínos (Coy et al., 2005), porém submetidos a tempos de exposição e concentrações de roscovitina distintas.

Conclusão

Portanto, a roscovitina se mostrou eficiente em inibir a retomada da meiose em complexos *cumulus*-oócitos de borregas cultivados *in vitro*, conferindo, deste modo, tempo adicional para adequada progressão da maturação citoplasmática e aquisição de competência oocitária. Novos estudos estão sendo realizados no sentido de verificar a reversibilidade da ação deste inibidor assim como seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Referências

- Coy, P.; Romar, R.; Payton, R. R.; McCann, L.; Saxton, A. M.; Edwards, J. L. 2005. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development in vitro. **Reproduction** 129(1):19-26, doi: 10.1530/rep.1.00299.
- Crocomo, L. F.; Ariu, F.; Bogliolo, L.; Bebbere, D.; Ledda, S.; Bicudo, S. D. 2016. In vitro developmental competence of adult sheep oocytes treated with roscovitine. **Reproduction in Domestic Animals** 51(2):276-281, doi: 10.1111/rda.12677.
- Han, D.; Lan, G. C.; Wu, Y. G.; Han, Z. B.; Wang, H. L.; Tan, J. H. 2006. Factors affecting the efficiency and reversibility of roscovitine (ROS) block on the meiotic resumption of goat oocytes. **Molecular Reproduction And Development** 73(2):238-246, doi: 10.1002/mrd.20398.
- Morton, K. M.; Maxwell, W. M. C.; Evans, G. 2008. Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and in vitro development of ovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals** 43(1):106-110, doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00866.x.
- Ptak, G.; Dattena, M.; Loi, P.; Tischner, M.; Cappai, P. 1999. Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. **Theriogenology**, 52(6):1105-1114, doi: 10.1016/S0093-691X(99)00198-3.
- Shirazi, A.; Shams-Esfandabadi, N.; Ahmadi, E.; Heidari, B. 2010. Effects of growth hormone on nuclear maturation of ovine oocytes and subsequent embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**. 45:530-536, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01290.x.